

## (12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
9 August 2001 (09.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/57217 A1**(51) International Patent Classification<sup>2</sup>: C12N 15/21Apt., Gaepo-3-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-243 (KR).  
KIM, Cha, Soon [KR/KR]; 106-903 Poonglim Apt., #664, Poongdukcheon-ree, Suji-eup, Yongin-shi, Gyeonggi-do 449-840 (KR). BAE, Sung, Min [KR/KR]; 303, #1587-8, Bongcheon-4-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-054 (KR). LEE, Gwan, Sun [KR/KR]; 2-806 Kukdong Apt., Garak-dong, Songpa-gu, Seoul 138-160 (KR).

(21) International Application Number: PCT/KR01/00097

(22) International Filing Date: 19 January 2001 (19.01.2001)

(25) Filing Language: Korean

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
2000-2434 19 January 2000 (19.01.2000) KR

(74) Agent(s): JANG, Seung, Ku et al.; First Law Offices of Korea, 17th Fl., KEC Building, #275-7, Yangjae-dong, Seocho-ku, Seoul 137-130 (KR).

(73) Applicant (for all designated States except US): BANMI PHARM. CO. LTD. [KR/KR]; #893-5, Hajeo-ri, Paldeomyeon, Hwaseong-gun, Kyungki-do 445-910 (KR).

(81) Designated States (national): AU, BE, CA, CN, JP, NZ, RU, SG, US.

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): KWON, Se, Chang [KR/KR]; 5-201 Banyang Apt., #789, Seobhong-1-dong, Gumiheon-gu, Seoul 153-031 (KR). JUNG, Sung, Youb [KR/KR]; 304-1402 Geoyeo Apt., #294, Geoyeo-2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-112 (KR). CHOI, Ki, Deu [KR/KR]; 601-407 Gaepo Jugong

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

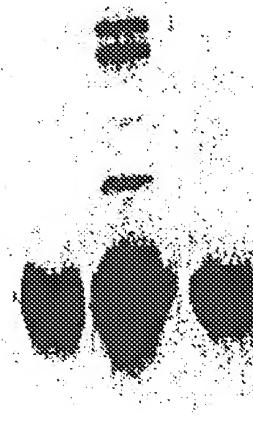
Published:

---- with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: EXPRESSION AND SECRETION VECTOR FOR HUMAN INTERFERON ALPHA AND PROCESS FOR PRODUCING HUMAN INTERFERON ALPHA BY EMPLOYING SAME

1 2 3

(57) Abstract: Disclosed in this invention are: an expression vector for the secretive production of human interferon alpha (hIFN $\alpha$ ) comprising a polynucleotide encoding a modified *E. coli* thermostable enterotoxin II signal sequence and a polynucleotide encoding hIFN $\alpha$  ligated to the 3'-end thereof; a microorganism transformed with the expression vector; and a process for secretly producing human interferon by culturing the microorganism, said process being capable of secreting a soluble form of active hIFN $\alpha$ , which does not contain an additional methionine residue at its N-terminal, into the periplasm of an *E. coli* cell.

WO 01/57217 A1

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-521925

(P2003-521925A)

(43)公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 12 N 15/09 1/21	Z NA	C 12 N 1/21	4 B 0 2 4
C 12 P 21/02		C 12 P 21/02	F 4 B 0 6 4
		C 12 N 15/00	Z NAA 4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21)出願番号 特願2001-558031(P2001-558031)  
(86) (22)出願日 平成13年1月19日(2001.1.19)  
(85)翻訳文提出日 平成14年7月19日(2002.7.19)  
(86)国際出願番号 PCT/KR01/00097  
(87)国際公開番号 WO01/057217  
(87)国際公開日 平成13年8月9日(2001.8.9)  
(31)優先権主張番号 2000-2434  
(32)優先日 平成12年1月19日(2000.1.19)  
(33)優先権主張国 韓国(KR)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, BR, CA, CN, JP, NZ, RU, SG, US

(71)出願人 ハンミ フーム、シーオー., エルティーディー。  
大韓民国 キョンギド ファソングン バルタンミョン ハヅリ 893-5  
(72)発明者 クウォン・セチャン  
大韓民国153-031ソウル、グムチヨング、シフン1ドン・ナンバー789番、ハンヤン・アパートメント5-201  
(72)発明者 ジュン・スンヨウブ  
大韓民国138-112ソウル、ソンバグ、ゴヨ2ドン・ナンバー294番、ゴヨ・アパートメント504-1402  
(74)代理人 弁理士 青山 葦 (外3名)

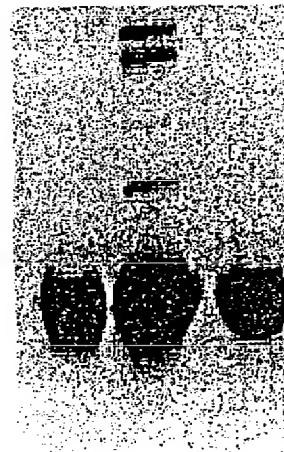
最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】ヒトインターフェロンアルファの発現分泌ベクターおよびそれを用いたヒトインターフェロンアルファの生産方法

(57)【要約】

大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその3'末端に連結された、ヒトインターフェロンアルファ(human Interferon  $\alpha$ : hIFN $\alpha$ )をコードするポリヌクレオチドを含むヒトインターフェロン $\alpha$ の分泌生産用発現ベクター、前記発現ベクターで形質転換された細胞株、および前記細胞株を培養することによりアミノ末端に追加のメチオニンが添加されていないインターフェロン $\alpha$ を大腸菌菌体ペリプラズムに分泌させて大量生産する方法に関する。

1 2 3



←インターフェロン  $\alpha$

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：3 のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列の 4、20 および 22 番目アミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその 3' 一末端に連結されたヒトイインターフェロン  $\alpha$  (hIFN  $\alpha$ ) をコードするポリヌクレオチドを含むヒトイインターフェロン  $\alpha$  の分泌生産用発現ベクター。

【請求項 2】 変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列が下記群から選ばれることを特徴とする請求項 1 記載の発現ベクター：

配列番号：3 のアミノ酸配列のうち 4 番アスパラギンがトレオニンに置換されたもの、

配列番号：3 のアミノ酸配列のうち 4 番アスパラギンおよび 22 番チロシンが各々トレオニンおよびグルタミンに置換されたもの、

配列番号：3 のアミノ酸配列のうち 4 番および 20 番アスパラギンが各々トレオニンおよびバリンに置換されたもの、

配列番号：3 のアミノ酸配列のうち 4 番アスパラギン、20 番アスパラギンおよび 22 番チロシンが各々トレオニン、バリンおよびグルタミンに置換されたもの。

【請求項 3】 hIFN  $\alpha$  をコードするポリヌクレオチドが配列番号：1 の IFN  $\alpha$ -2a または配列番号：2 の IFN  $\alpha$ -2b をコードすることを特徴とする請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 4】 変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドの 5' 一末端前に大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIのシャイン-ダルガーノ配列 (SD sequence. 配列番号：8) またはその変形体をさらに含むことを特徴とする請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 5】 前記変形体は、配列番号：8 の配列において 5' 一末端の G A G G 以降に 1 個または 2 個のヌクレオチドが欠損されたものであることを特徴とする請求項 4 記載の発現ベクター。

【請求項 6】 SD 配列の変形体が配列番号：9 のヌクレオチド配列を有す

ることを特徴とする請求項4記載の発現ベクター。

【請求項7】 ベクター-pT14SS1 $\alpha$ -2a-4T、pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T、pT14SS1 $\alpha$ -2a-4T22Q、pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T22Q、pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T20V22Q、pT14NSS1 $\alpha$ -2a-4T22Q、pT14MSS1 $\alpha$ -2a-4T22Q、pT14SS1 $\alpha$ -2b-4T、pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T、pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T22QおよびpT140SS1 $\alpha$ -2a-4T20V22Qからなる群から選ばれることを特徴とする請求項1記載の発現ベクター。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一項の発現ベクターで形質転換された微生物。

【請求項9】 大腸菌であることを特徴とする請求項8記載の微生物。

【請求項10】 大腸菌BL21(DE3)/pT14SS1 $\alpha$ -2a-4T (HM 10602)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T (HM 10603；寄託番号：KCCM-10175)、大腸菌BL21(DE3)/pT14SS1 $\alpha$ -2a-4T22Q (HM 10604)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T22Q (HM 10611；寄託番号：KCCM-10176)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T20V22Q (HM 10612)、大腸菌BL21(DE3)/pT14NSS1 $\alpha$ -2a-4T22Q (HM 10613)、大腸菌BL21(DE3)/pT14MSS1 $\alpha$ -2a-4T22Q (HM 10614)、大腸菌BL21(DE3)/pT14SS1 $\alpha$ -2b-4T (HM 10702)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T (HM 10703；寄託番号：KCCM-10177)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T22Q (HM 10711；寄託番号：KCCM-10178)、および大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T20V22Q (HM 10712)からなる群から選ばれることを特徴とする請求項9記載の微生物。

【請求項11】 配列番号：3のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列の4、20および22番目アミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその3'一末端に連結されたhIFN $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドを含むhIFN $\alpha$ の分泌生産用発現ベクターで微生物を形質転換し、形質転換された微生物を適切な条件下で培養することによりアミノ末端にメチオニンが添加されていない活性hIFN $\alpha$ を分泌生産する方法。

【請求項12】 変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列が下記群から選ばれることを特徴とする請求項11記載の方法：

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギンがトレオニンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギンおよび22番チロシンが各々トレオニンおよびグルタミンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番および20番アスパラギンが各々トレオニンおよびバリンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギン、20番アスパラギンおよび22番チロシンが各々トレオニン、バリンおよびグルタミンに置換されたもの。

【請求項13】 hIFN $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドが配列番号：1のIFN $\alpha$ -2aまたは配列番号：2のIFN $\alpha$ -2bをコードすることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項14】 前記発現ベクターは、変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドの5'一末端前に大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIのシャインダルガーノ配列(SD sequence, 配列番号：8)またはその変形体をさらに含むことを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項15】 前記変形体は、配列番号：8の配列において5'一末端のGAGG以降に1個または2個のヌクレオチドが欠損されたものであることを特徴とする請求項14記載の発現ベクター。

【請求項16】 SD配列の変形体が配列番号：9の配列を有することを特徴とする請求項14記載の発現ベクター。

【請求項17】 前記発現ベクターがベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4T、pT140SSI $\alpha$ -2a-4T、pT14SSI $\alpha$ -2a-4T22Q、pT140SSI $\alpha$ -2a-4T22Q、pT140SSI $\alpha$ -2a-4T20V22Q、pT14NSSI $\alpha$ -2a-4T22Q、pT14MSSI $\alpha$ -2a-4T22Q、pT14SSI $\alpha$ -2b-4T、pT140SSI $\alpha$ -2b-4T、pT140SSI $\alpha$ -2b-4T22QおよびpT140SSI $\alpha$ -2a-4T20V22Qからなる群から選ばれることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項18】 前記形質転換された微生物が大腸菌BL21(DE3)/pT14SSI $\alpha$ -2a-4T(HM 10602)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SSI $\alpha$ -2a-4T(HM 10603；寄託番号：KCCM-10175)、大腸菌BL21(DE3)/pT14SSI $\alpha$ -2a-4T22Q(HM 10604)、大腸菌BL21(DE3)

) /pT140SS $\alpha$ -2a-4T22Q (HM 10611 ; 寄託番号 : KCCM-10176) 、大腸菌BL21(DE3) /  
pT140SS $\alpha$ -2a-4T20V22Q (HM 10612) 、大腸菌BL21(DE3) /pT14NSS $\alpha$ -2a-4T22Q(H  
M 10613) 、大腸菌BL21(DE3) /pT14MSS $\alpha$ -2a-4T22Q(HM 10614) 、大腸菌BL21(DE3)  
/pT14SS $\alpha$ -2b-4T (HM 10702) 、大腸菌BL21(DE3) /pT140SS $\alpha$ -2b-4T (HM 10703 ;  
寄託番号 : KCCM-10177) 、大腸菌BL21(DE3) /pT140SS $\alpha$ -2b-4T22Q (HM 10711 ; 寄  
託番号 : KCCM-10178) 、および大腸菌BL21(DE3) /pT140SS $\alpha$ -2b-4T20V22Q (HM 107  
12) からなる群から選ばれることを特徴とする請求項 1 1 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 【○○○1】

#### 発明の分野

本発明は、大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその3'一末端に連結された、ヒトイインターフェロンアルファ(human Interferon  $\alpha$  : hIFN $\alpha$ )をコードするポリヌクレオチドを含むヒトイインターフェロン $\alpha$ の分泌生産用発現ベクター、前記発現ベクターで形質転換された細胞株、および前記細胞株を培養することによりアミノ末端に追加のメチオニンが添加されていないヒトイインターフェロン $\alpha$ を大腸菌菌体のペリプラズムに分泌させて大量生産する方法に関する。

### 【○○○2】

#### 背景技術

アイザックス(Isaacs)とリンデンマン(Lindenmann)は、1957年鶏をインフルエンザウイルスAで感染させるとウイルスの複製を阻害する因子であるインターフェロンが生産されることを発見し、報告した(Isaacs, K. and Lindenmann, J., Proc. R. Soc. Lond., B147, 258-267, 1957)。

### 【○○○3】

ヒトイインターフェロンは一種のサイトカインであり、生体内免疫反応またはウイルスの増殖を阻害するタンパク質であって、これらを生成する細胞の種類によってインターフェロンアルファ(IFN $\alpha$ )、インターフェロンベータ(IFN $\beta$ )およびインターフェロンガンマ(IFN $\gamma$ )に分けられる(Kirchner, H., et al., Tex. Rep. Biol. Med., 41, 89-93, 1981; Stanton, G. J., et al., Tex. Rep. Biol. Med., 41, 84-88, 1981)。

### 【○○○4】

これらのインターフェロンは、抗ウイルス機能、抗癌機能、NK(Natural Killer)細胞の活性化および骨髄細胞の抑制機能において互いに相乗作用を有していることが知られている(Klimpel, et al., J. Immunol., 129, 76-78, 1982; Fieischmann, W. R., et al., J. Natl. Cancer Inst., 65, 863-966, 1980; Weigent., et al., Infect. Immun., 40, 35-38, 1980)。また、インターフェロンは

細胞内遺伝子の発現、構造、そして機能の調節因子として作用し、直接的な抗増殖効果 (anti-proliferating effect) を示す。

【○○○5】

インターフェロン $\alpha$ はB細胞分裂因子(mitogen)、ウイルスまたは癌細胞によって白血球が刺激されたとき生成するもので、今まで20種以上のインターフェロンをコードする遺伝子が報告され、これは各々165個または166個のアミノ酸からなると知られている。

【○○○6】

初期の臨床試験に用いられたインターフェロン $\alpha$ はセンダイウイルス (Sendai virus)で刺激されたバッフィ・コート白血球(buffy coat leukocyte)から得られたもので、この際の純度はわずか1%程度に過ぎなかつた(Cantell, K. and Hirvonen., Tex. Rep. Biol. Med., 35, 138-144, 1977)。

【○○○7】

80年代に入り、遺伝子組換え技術によって生理活性を有するインターフェロン $\alpha$ を大量生産できるようになり(Goeddel, D. V. et al., Nature, 287, 411-416, 1980)、このような組換えヒトインターフェロン $\alpha$ を用いた臨床試験の結果、種々の固形癌の治療に効果があること、特に、膀胱癌、腎臓癌と後天性免疫欠乏症に係るカポジ肉腫などに効果があることが示された(Torti, F.M., J. Clin. Oncol., 6, 476-483, 1988; Vugrin, D., et al., Cancer Treat. Rep., 69, 817-820, 1985; Rios, A., et al., J. Clin. Oncol., 3, 506-512, 1985)。また、最近は、C型肝炎ウイルスの治療にも効果があることが報告されており(Davis, G. G., et al., N. Engl. J. Med., 321, 1501-1506, 1989)、その治療剤としての適用範囲が日増しに拡大されている。

【○○○8】

白血球からのインターフェロン $\alpha$ 遺伝子をクローニング(cloning)した結果、インターフェロン $\alpha$ が少なくとも10個の異なる遺伝子で構成された遺伝子群によってコードされると明らかになったが、これは、DNA配列の遺伝子生成物が一つの均一なタンパク質を生成することではなく、インターフェロン $\alpha$ が類似する構造を有するサブタイプタンパク質の混合物であることを意味する。このよう

なサブタイプタンパク質はインターフェロン $\alpha$ -1、2、3…などと称する(Nature 290, 20-26, 1981)。

#### 【〇〇〇九】

種々のインターフェロンのうち、ヒトの白血球から精製されたヒトインターフェロン $\alpha$ は分子量が17,500~21,000程度であり、タンパク質mg当たり $2 \times 10^8$  IU程度の非常に高い固有活性を有している。生体内インターフェロン $\alpha$ は165個のアミノ酸で構成されたタンパク質で、23番目アミノ酸がリジンの場合がインターフェロン $\alpha$ -2a(配列番号：1)、23番目アミノ酸がアルギニンの場合がインターフェロン $\alpha$ -2b(配列番号：2)である。ヒトインターフェロン $\alpha$ を生産する方法として、初期には細胞培養法を用いる方法が知られていたが、この方法は生産性が1リットル当たり $250 \mu\text{g}$ 程度に過ぎないため、大量生産には適していない。

#### 【〇〇一〇】

したがって、その後は遺伝子組換え技術によって微生物から比較的簡便な方法で多量のインターフェロンを生産する技術が開発され、現在まで使用されている。

#### 【〇〇一一】

最も一般的に使用されている大腸菌を用いた製造方法においては、大腸菌細胞の特性によって開始コドンの位置に存在するATGコドンの作用によってN-末端にメチオニン残基がもう一つ添加された166個または167個アミノ酸からなるインターフェロン $\alpha$ が製造されるようになるが、ヒト成長ホルモンの場合は、付加されたメチオニン残基によって人体に有害な免疫反応が誘発され得ることが報告されている(ヨーロッパ特許公開第256,843号)。

#### 【〇〇一二】

さらに、発現されたインターフェロン $\alpha$ の大部分が不溶性封入体の形で細胞質内に蓄積されるので、発現されたインターフェロン $\alpha$ は精製工程中に必ずリフォールディング工程を経て活性化された形態に転換されなければならない。このようなリフォールディング工程は非常に非効率的であり、インターフェロン $\alpha$ が部分的に還元された状態に存在するか、分子間ジスルフィド結合体または誤ったジ

スルフィド結合体などを形成するので、これを精製工程で再度除去しなければならないという難しさがあり、この際力価の損失が多くなる。特にミスフォールディング(misfolding)されたインターフェロンのような望ましくないインターフェロンを除去することが難しい。

【〇〇一三】

このような問題を解決するために、最近では菌体内生産よりN-末端にメチオニンの付加なしに可溶化状態で有用タンパク質を分泌生産する方法が開発されている。

【〇〇一四】

このような方法において、目的とする組換えタンパク質はN-末端にシグナルペプチドが付加された融合タンパク質として発現される。この融合タンパク質が細胞質膜を通過するとき、シグナルペプチドは大腸菌内の酵素によって除去され、天然型の目的タンパク質が分泌される。

【〇〇一五】

分泌生産方法では、アミノ酸配列および高次構造とも野生型と同様なタンパク質が得られるので、菌体内生産方法より有利である。しかし、分泌生産方法は菌体内生産方法に比べて、膜通過および連続精製工程の効率が低いので、生産量が少ない。特に、哺乳類由来のタンパク質を原核生物を用いて分泌生産すると、原核生物由来のタンパク質を分泌生産した場合に比べて生産効率が非常に低いと知られている。いきおい効率的な分泌生産方法の開発が望まれていた。そして、韓国特許公告第93-1387号は、大腸菌のアルカリンホスファターゼのシグナルペプチドを用いてインターフェロン $\alpha$ の大量生産を試したが、その生産量が培養液リットル当たり $10^9$  IU( $10\text{mg}/\text{培養液L}$ )程度と非常に少なかつた。したがって、微生物を用いてアミノ末端にメチオニン残基が付加されていない可溶性インターフェロン $\alpha$ を大量生産できる方法が切実に要求されている。

【〇〇一六】

そこで、本発明者らは前記問題を解決しようと鋭意研究した結果、既知の大腸菌(E. coli)の分泌タンパク質である熱安定性エンテロトキシンIIのシグナルペプチドを変化して高い発現率を示す新たなシグナルペプチドを製造し(韓国特許

出願第98-38061号および韓国特許出願第99-27418号)、これを用いて大量の天然型インターフェロン $\alpha$ が得られることを発見した。すなわち、変形された大腸菌シグナルペプチドにエンテロトキシンIIコード遺伝子の代りにインターフェロン $\alpha$ コード遺伝子を連結させた遺伝子を含む発現ベクターを製造し、この発現ベクターにより形質転換した形質転換微生物を培養することにより、天然型生物学的活性を有するインターフェロン $\alpha$ を大量分泌生産するのに成功した。

【0017】

発明の要約

したがって、本発明の目的は、ヒトインターフェロン $\alpha$ を分泌生産できる発現ベクターを提供することである。

【0018】

本発明の他の目的は、前記発現ベクターで形質転換された微生物を提供することである。

【0019】

本発明のまた他の目的は、前記微生物を用いてアミノ末端にメチオニン残基が付加されていない可溶性ヒトインターフェロン $\alpha$ を大量生産する方法を提供することである。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明の一実施態様によれば、大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列（以下、STII変異体と称す）をコードするポリヌクレオチドおよびその3'一末端に連結された、ヒトインターフェロン $\alpha$  (human Interferon  $\alpha$ : hIFN $\alpha$ )をコードするポリヌクレオチドを含むヒトインターフェロン $\alpha$ の分泌生産用の発現ベクターが提供される。

【0021】

本発明の発現ベクターの製造のために使用されるヒトインターフェロン $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドは、天然型ヒトインターフェロン $\alpha$ -2a (配列番号: 1)、インターフェロン $\alpha$ -2b (配列番号: 2)、インターフェロン $\alpha$ -1、

インターフェロン $\alpha$ -3など任意のヒトインターフェロン $\alpha$ のサブタイプをコードするポリヌクレオチドであってもよく、このヒトインターフェロン $\alpha$ サブタイプのいずれか一つをコードする変形された塩基配列を有する組換えポリヌクレオチドであってもよい。

#### 【0022】

インターフェロン $\alpha$ を分泌生産するための目的で本発明のベクターにおいてヒトインターフェロン $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドの5'一末端の前に連結される、大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：3のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形体、好ましくは4、20および22番目アミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形体をコードするポリヌクレオチドであってもよい。そのようなポリヌクレオチドは、たとえば、配列番号：3のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列(STII)から4番アミノ酸がトレオニンに置換されるか([Thr<sup>4</sup>] STII)；4番アミノ酸がトレオニンに、22番アミノ酸がグルタミンに各々置換されるか([Thr<sup>4</sup>, Gln<sup>22</sup>] STI I)；4番アミノ酸がトレオニンに、20番アミノ酸がバリンに、22番アミノ酸がグルタミンに各々置換されるか([Thr<sup>4</sup>, Val<sup>20</sup>, Gln<sup>22</sup>] STII)；4番アミノ酸がトレオニンに、20番アミノ酸がバリンに各々置換された([Thr<sup>4</sup>, Val<sup>20</sup>] ST II)変形体をコードするもので、好ましくは各々配列番号：4、5、6および7のポリヌクレオチド配列を有する。しかし、コドンの縮退性(degeneracy)によって本発明の変異体をコーディングする様々なポリヌクレオチドが存在してもよく、特にアミノ酸配列に影響を及ぼさず、大腸菌的好むコドンを選択して変化されたポリヌクレオチドを使用することにより、インターフェロン $\alpha$ の発現量を遙かに増加させることができる。

#### 【0023】

さらに、本発明の発現ベクターは、インターフェロン $\alpha$ の発現および分泌量をさらに増加させるために、大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシャインダルガーノ配列(Shine-Dalgarno sequence ; SD配列)(配列番号：8)またはその

変形体を変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドの5'一末端の前にさらに含んでもよい。前記SD配列の変形体は配列番号：8の大腸菌の熱安定性エンテロトキシンII SD配列のうち5'一末端のGAGG以下の塩基数が正常の7つ(TGATTTT)より減少した6個または5個を有するもので、これらを用いるとインターフェロン $\alpha$ の分泌発現率が増加する。しかし、塩基数が4個より少なくなる場合は発現率が著しく減少する。本発明では、配列番号：9の配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンII SD配列の変形体を使用することが特に好ましい。

#### 【0024】

本発明の発現ベクターの製造に用いられるプロモーターとしては、微生物において異種タンパク質を発現できる任意のプロモーターであり得、特に大腸菌で異種タンパク質を発現させる場合lacプロモーター、Tlacプロモーター、アラビノースプロモーターなどが好ましい。

#### 【0025】

また、本発明では前記発現ベクターで微生物、たとえば、大腸菌BL21(DE3)(Novagen, USA)、大腸菌XL-1 blue( Novagen, USA)のような大腸菌菌株を形質転換して製造された形質転換微生物が提供される。このような形質転換微生物としては、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T(「HM 10603」)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2a-4T22Q(「HM 10611」)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T(「HM 10703」)および大腸菌BL21(DE3)/pT140SS1 $\alpha$ -2b-4T22Q(「HM 10711」)を例示することができ、これらは微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定により、1999年12月23日付で韓国微生物保存センター(KCCM)(住所: 120-221大韓民国ソウル西大门区弘濟1洞Yuriim B/D 361-221)寄託番号: 第KCCM-10175号、第KCCM-10176号、第KCCM-10177号および第KCCM-10178号として各々寄託された。

#### 【0026】

さらに、本発明では前記形質転換体を適切な条件下で培養することにより、アミノ末端に追加のメチオニンが添加されていないインターフェロン $\alpha$ を大腸菌ペリプラズム内に大量分泌生産する方法が提供される。培養条件は微生物形質転換

体の通常の培養条件と同様である。

【〇〇二七】

本発明の方法を用いて分泌生産できるインターフェロン $\alpha$ には、165個のアミノ酸からなる天然型ヒトインターフェロン $\alpha-2\text{a}$ （配列番号：1）およびインターフェロン $\alpha-2\text{b}$ （配列番号：2）だけでなく、インターフェロン $\alpha-1$ 、インターフェロン $\alpha-3$ など任意のヒトインターフェロン $\alpha$ サブタイプが含まれる。また、本発明の方法はインターフェロン $\beta$ およびインターフェロン $\gamma$ など他のインターフェロンの分泌生産に適用してもよい。

【〇〇二八】

本発明によれば、大腸菌形質転換体によって生産されたインターフェロン $\alpha$ のうち80%以上がペリプラズム内に分泌されるので、インターフェロン $\alpha$ を培養培地1リットル当たり1g以上の高い収率で分泌生産でき、このように生産されたインターフェロン $\alpha$ はアミノ末端部位に他のアミノ酸の付加なしに天然型と同様なアミノ酸配列を有し、細胞内で天然型のインターフェロン $\alpha$ と同様の生物学的力値を示す。

【〇〇二九】

以下、本発明を下記実施例によってさらに詳細に説明するが、かかる実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

【〇〇三〇】

参考例：インターフェロン $\alpha-2\text{a}$ 遺伝子およびそれを含むベクターの製作

ヒトインターフェロン $\alpha-2\text{a}$ 遺伝子を得るために、ヒトゲノムDNAを鋳型とし、配列番号：10および11の塩基配列を有するオリゴプライマーとして用いた重合酵素連鎖反応（PCR）を行った。配列番号：10のプライマーは天然型hIFN $\alpha$ の一番アミノ酸であるシスティンの上流に制限酵素Nde I認識部位（5'-CA TATG-3'）を設けるようにデザインし、配列番号：11のプライマーは終了コドンの後側に制限酵素BamH I認識部位（5'-GGATCC-3'）を設けるようにデザインされた。

【〇〇三一】

増幅されたPCR産物をNdeIとBamHIで切断してhIFN $\alpha-2\text{a}$ をコードするDNA

断片を得た。前記DNA断片をベクターpET-14b (Novagen, USA)のNde I/BamHI切断部位に挿入してベクターpT-IFN $\alpha$ -2aを得た。

図1は、ベクターpT-IFN $\alpha$ -2aの製作過程を示す。

#### 【0032】

比較例1：エンテロトキシンシグナル配列およびIFN $\alpha$ -2a遺伝子を含有するベクターの製作

大腸菌エンテロトキシンIIシグナル配列遺伝子を製造するために、大腸菌エンテロトキシンIIシグナル配列の公知のヌクレオチド配列に基づいて配列番号：12および13の相補的なオリゴヌクレオチド対を考案し、DNAシンセサイザ(Model 380B, Applied Biosystem, USA)を用いて合成した。前記オリゴヌクレオチドは、大腸菌エンテロトキシンIIの開始コドン前に制限酵素BspH I認識部位（制限酵素Nco I認識部位と相補的である）を有し、3'一末端にはアミノ酸の変化なしにコドンのみを変えて制限酵素Mlu I認識部位を有するように考案された。2つのオリゴヌクレオチドを95°Cでアニーリングして大腸菌エンテロトキシンIIシグナル配列遺伝子を含有する平滑一末端DNA断片を製造した。該DNA断片をベクターpUC19(Biolabs, USA)のSma I部位に挿入してベクターpUC19STを製作した。

#### 【0033】

また、エンテロトキシンシグナルペプチドとIFN $\alpha$ -2a遺伝子を連結するために、IFN $\alpha$ -2a遺伝子を含有する参考例のベクターpT-IFN $\alpha$ -2aを鑄型とし、配列番号：14および15のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行った。配列番号：14のプライマーはIFN $\alpha$ -2a遺伝子の5'一末端に対応し、配列番号：15のプライマーは終了コドン後に制限酵素BamH I認知配列（5'-GGATC-3'）を挿入するように考案された。天然型IFN $\alpha$ -2aをコードするポリヌクレオチド配列を含有するDNA断片を前記ポリヌクレオチドプライマーを用いたPCRによって増幅した。増幅されたDNA断片を制限酵素Mlu IとBamH Iで切断してMlu IとBamH I末端を有するIFN $\alpha$ -2a DNA断片を製造した。

#### 【0034】

一方、エンテロトキシンシグナルペプチドを含有するベクターpUC19STを制限

酵素MluIで切斷した後制限酵素BamHIで消化してMluIとBamHI末端を有するベクター断片を得た。該ベクター断片を前記のIFN  $\alpha$ -2a DNA断片と連結してベクターpUC19S IFN  $\alpha$ -2aを製作した。

#### 【〇〇三五】

ベクター-pUC19S IFN  $\alpha$ -2aを制限酵素BspHIとBamHIでさらに切斷してDNA断片(564 bp)を回収した。ベクター-pET-14b (Novagen)をNcoIとBamHIで切斷してベクター断片を作った後、前記DNA断片とベクター断片を互いに連結してベクター-pT14S IFN  $\alpha$ -2aを製作した。図2は、ベクター-pT14S IFN  $\alpha$ -2aの製作過程を示す。

#### 【〇〇三六】

次いで、大腸菌BL21(DE3)菌株を70 mM塩化カルシウム溶液で処理してコンピテント大腸菌に製造し、10 mMトリス緩衝液(pH 7.5)中のベクター-pT14S IFN  $\alpha$ -2aの懸濁液を加えた。ベクターによって伝達された抗生物質に対する耐性および感受性を用いて通常の方法で形質転換株を選択することにより、IFN  $\alpha$ -2aを発現する大腸菌形質転換株HM 10600を製造した。

#### 【〇〇三七】

また、ベクター-pT14S IFN  $\alpha$ -2aを鋳型とし、配列番号：16および17の合成オリゴヌクレオチドを用いたPCR法によってエンテロトキシンのシャイン-ダルガーノ配列、エンテロトキシンシグナルペプチドおよびIFN  $\alpha$ -2a遺伝子が順番に連結されたDNA断片を得た後、これをXbaIとBamHIで切斷して挿入体を得た。

ベクター-pET-14b (Novagen)をXbaIとBamHIで切斷したベクター断片と前記の挿入体を連結してベクター-pT14SS IFN  $\alpha$ -2aを製作した。図3は、ベクター-pT14SS IFN  $\alpha$ -2aの製作過程を示す。大腸菌BL21(DE3)をベクター-pT14SS IFN  $\alpha$ -2aで形質転換して大腸菌形質転換株HM 10601を製造した。

#### 【〇〇三八】

比較例2：エンテロトキシンシグナル配列およびIFN  $\alpha$ -2b遺伝子を含有するベクターの製作

特定部位置換法(site directed mutagenesis)(Papworth, C. et al., Strategies, 9, 3(1996))に従って、ベクター-pT14SS IFN  $\alpha$ -2aに含まれたINF  $\alpha$ -2a遺伝子の

23番位置のリジンコドンをアルギニンコドンに置換することにより、IFN $\alpha$ -2b遺伝子を含む発現ベクターを製作した。鋳型としてベクターpT14SS1 $\alpha$ -2aを置換されたコドンを含有する下記配列番号：19および20の合成オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションしてハイブリッド分子を形成し、このオリゴヌクレオチドを経て5'→3'方向に延長したp<sub>f</sub>u (Stratagene)と4つのヌクレオチドトリホスフェート(ATP, GTP, TTP, CTP)を用いてDNA增幅を行った。

インターフェロン $\alpha$ -2b配列

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys (配列番号：18)

CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC (配列番号：19)

GCA GGA GAA AAG AGA GAT TCT CCT CAT CTG TGC CAG GAG (配列番号：20)

【○○39】

増幅されたDNA断片を回収し、これに制限酵素DpnIを加えて転換されていないベクターを完全に除去した。

変形されたプラスミドを用いて大腸菌 XL-1 blue (Novagene) を形質転換した後、形質転換されたコロニーから回収されたDNAの塩基配列を決定し、IFN $\alpha$ -2aの23番アミノ酸のリジンがアルギニンに置換された遺伝子を含むベクターpT14SS1 $\alpha$ -2bを製造した。

【○○40】

次いで、前記ベクターpT14SS1 $\alpha$ -2bを用いて前記比較例1と同様の方法で大腸菌BL21(DE3)菌株を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10701を得た。この形質転換株を培養して生産されたタンパク質のN-末端アミノ酸配列を分析した結果、天然型と同様なアミノ酸配列を有するインターフェロン $\alpha$ -2bの発現を確認した。

【○○41】

実施例1：エンテロトキシンシグナルペプチド変形体を含有するベクターの製作

(1) [Thr<sup>4</sup>] STIIを含むベクターの製作

エンテロトキシンシグナル配列ペプチド中の特定アミノ酸残基のみを変形させるために公知の方法である特定部位置換法 (site directed mutagenesis方法)

を用いてエンテロトキシン変形体シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを次の通りに製造した。

#### 【〇〇42】

まず、比較例2のような特定部位置換法により、前記比較例1で製造されたベクターpT14SSI $\alpha$ -2aを配列番号：22および23のオリゴヌクレオチドを用いたPCRに付し、エンテロトキシンシグナル配列の4番目アミノ酸をトレオニン（Thr）に置換した変形されたプラスミドを製造した。

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu (配列番号：21)  
5'-GGTGATTT ATG AAA AAG ACA ATC GCA TTT CTT C-3' (配列番号：22)  
3'-CCACTAAAA TAC TTT TTC TGT TAG CGT AAA GAA G-5' (配列番号：23)

#### 【〇〇43】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blue (Novagene, USA)を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、4番目アミノ酸がThrに変形されたエンテロトキシンシグナル配列ペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれたベクターを得た。前記ベクターをXbaIとMluIで切断し、次いで、ベクターpT14SSI $\alpha$ -2aのXbaI/MluI部位に挿入してベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4Tを製作した。

#### 【〇〇44】

次いで、前記ベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4Tを用いて大腸菌BL21(DE3) (Stratagene, USA)を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10602を得た。

また、同様の方法でpT14SSI $\alpha$ -2bを用いてpT14SSI $\alpha$ -2b-4Tベクターを製造し、後大腸菌BL21(DE3)を形質転換して大腸菌形質転換株HM10702を得た。

#### 【〇〇45】

(2) [Thr<sup>4</sup>, Gln<sup>22</sup>] STIIを含むベクターの製作  
4番アミノ酸がThrに置換されたエンテロトキシンシグナル配列ペプチドの2番目アミノ酸をGlnにさらに置換するために、前記段階（1）で製造されたベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4Tおよび配列番号：25および26のオリゴヌクレオチドを用いて比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターを製造した。  
Asn Ala Gln Ala Cys Asp Leu Pro (配列番号：24)

5' -CA AAT GCC CAA GCG TGT GAT CTG CCT-3' (配列番号 : 25)

3' -GT TTA CGG GTT CGC ACA CTA GAC GGA-5' (配列番号 : 26)

【〇〇46】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blue (Novagene, USA) を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、4番目アミノ酸がThrに、22番目アミノ酸がGlnに各々変形されたエンテロトキシンシグナル配列を含むベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4T22Qを得た。次いで、前記ベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4T22Qを用いて前記段階(1)と同様な方法で大腸菌BL21(DE3) (Stratagene, USA) を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10604を得た。

【〇〇47】

前記のように変形されたエンテロトキシンシグナル配列のシャインーダルガーノ配列を配列番号: 9のように変形させるために、前記で製造されたベクターpT14SSI $\alpha$ -2a-4TおよびpT14SSI $\alpha$ -2a-4T22Qを鋳型とし、配列番号: 27および28のオリゴヌクレオチドを用いて段階(2)のような特定部位置換法によって変形されたベクターを製造した。

【〇〇48】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blue (Novagene, USA) を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、エンテロトキシンシグナル配列のシャインーダルガーノ配列を変形させたベクターpT140SS $\alpha$ -2a-4TとpT140SSI $\alpha$ -2a-4T22Qを得た。図4は、ベクターpT140SSI $\alpha$ -2a-4T22Qの製作過程を示す。

【〇〇49】

次いで、それぞれ前記ベクターpT140SSI $\alpha$ -2a-4TとpT140SSI $\alpha$ -2a-4T22Qを用いて大腸菌BL21(DE3) を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10603とHM 10611を得、これを1999年12月23日付で韓国微生物保存センター(KCCM)に寄託番号第KCCM-10175号および第KCCM-10176号として寄託した。

また、同様の方法でpT14SSI $\alpha$ -2bを用いてpT140SSI $\alpha$ -2b-4TとpT140SSI $\alpha$ -2b-4T22Qのベクターを製造した後大腸菌BL21(DE3) を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10703とHM 10711を得、これを1999年12月23日付で韓国微生物保存セ

ンター(KCOM)に寄託番号第KCOM-10177号および第KCOM-10178号として各々寄託した。

#### 【〇〇五〇】

(3) [Thr<sup>4</sup>, Val<sup>20</sup>, Gln<sup>22</sup>] STIIを含むベクターの製作

4番アミノ酸がThrに、22番アミノ酸がGlnに置換されたエンテロトキシンシグナル配列ペプチドの20番目アミノ酸をValにさらに置換するために、前記段階(2)で製造されたベクターpT140SS1 $\alpha$ -2a-4T22QおよびpT140SS1 $\alpha$ -2b-4T22Qを各々鋳型とし、配列番号：29および30のオリゴヌクレオチドを用いて前記段階(2)のような特定部位置換法によって変形されたベクターpT140SS1 $\alpha$ -2a-4T20V22QとpT140SS1 $\alpha$ -2b-4T20V22Qを製造した。

#### 【〇〇五〇】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌 XL-1 blue (Novagen, USA) を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、エンテロトキシンシグナル配列のうち4番目、20番目および22番目アミノ酸が各々アスパラギン、アスパラギン、チロシンからトレオニン、バリンおよびグルタミンに置換された配列を有するインターフェロン $\alpha$ 発現ベクターpT140SS1 $\alpha$ -2a-4T20V22QおよびpT140SS1 $\alpha$ -2b-4T20V22Qを得、変形されたプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10612およびHM 10712を各々得た。

#### 【〇〇五二】

実施例2：熱安定性エンテロトキシンIIシャインダルガーノ配列変形体の製造

前記で製造された発現ベクターに含まれた熱安定性エンテロトキシンIIシャインダルガーノ配列のうち、リボソーム結合部位と大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列の開始コドンであるATG配列間の塩基数を減らすために、前記の比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターを製造した。

#### 【〇〇五三】

すなわち、リボソーム結合部位GAGGから開始コドンであるATG配列までの塩基数を正常の7個から5個に減らすために、前記実施例1の(2)で製造された

ベクターpT140SS| $\alpha$ -2a-4T22Qを鋳型とし、配列番号：3 1および3 2のオリゴスクレオチドを用いて比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターpT14NSS| $\alpha$ -2a-4T22Qを製造した。また、リボソーム結合部位GAGGから開始コドンであるA T G配列までの塩基数を4個に減らすためにpT14NSS| $\alpha$ -2a-4T22Qを鋳型とし、配列番号：3 3および3 4のオリゴスクレオチドを用いて比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターpT14MSS| $\alpha$ -2a-4T22Qを製造した。

#### 【O O 5 4】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blueを形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、リボソーム結合部位GAGGから開始コドンであるATG配列までの塩基数が5個と4個に各々減少した塩基配列を有するインターフェロン $\alpha$ 発現プラスミドpT14NSS| $\alpha$ -2a-4T22QおよびpT14MSS| $\alpha$ -2a-4T22Qを得、この発現プラスミドで大腸菌BL21(DE3)を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10613およびHM 10614を得た。

#### 【O O 5 5】

##### 実施例3：インターフェロン $\alpha$ -2の発現量比較

前記比較例および実施例で得られた大腸菌形質転換体を各々LB培地で培養した後IPTGを加えて3時間培養した。各々の培養液を6,000 rpmで20分間遠心分離した後、沈殿した細胞塊を浸透圧ショック法(Nossal, G. N., J. Biol. Chem., 241, 3055, 1966)に従って次のように処理した。

#### 【O O 5 6】

すなわち、沈殿物分画を元来培養液量の10分の1容積の等張液(20%スクロース、1mM EDTAを含有する10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.0))に懸濁し、前記懸濁液を室温で30分間放置した後、遠心分離して菌株を回収した。次に、回収された菌体を4℃の蒸留水に懸濁することにより、菌体のペリプラズムに存在するタンパク質を抽出した。懸濁液を遠心分離して菌体成分を除去し、上澄液をペリプラズム分画として回収した。ペリプラズム分画として回収されたインターフェロン $\alpha$ -2の濃度をインターフェロン $\alpha$ -2に対する抗体(R&D, USA)を用いた通常の酵素免疫測定法(Kato, K. et al., J. Immunol., 116

, 1554, 1976)に従って測定し、その測定値から培養培地 1 リットル当たりのインターフェロン  $\alpha$ -2 の分泌量を換算した。前記結果を表 1 に示す。

【0057】

【表 1】

表 1 インターフェロン  $\alpha$ -2 の発現量比較

発現宿主	実施例	発現ベクター	STII 内の 変形アミノ 酸残基	ペリプラズム内 IFN $\alpha$ -2 生産量*
HM 10600	比較例 1	pT14SI $\alpha$ -2a		82 ±40
HM 10601	比較例 1	pT14SSI $\alpha$ -2a		325 ±75
HM 10701	比較例 2	pT14SSI $\alpha$ -2b		288 ±90
HM 10602	実施例 1 (1)	pT14SSI $\alpha$ -2a-4T	Thr <sup>4</sup>	550 ±120
HM 10603	実施例 1 (2)	pT14OSSI $\alpha$ -2a- 4T	Thr <sup>4</sup>	1,020 ±135
HM 10604	実施例 1 (2)	pT14SSI $\alpha$ -2a- 4T22Q	Thr <sup>4</sup> , Gln <sup>22</sup>	680 ±105

HM 10611	実施例 1 (2)	pT14OSSI $\alpha$ -2a- 4T22Q	Thr <sup>4</sup> , Gln <sup>22</sup>	1,220 $\pm$ 120
HM 10612	実施例 1 (3)	pT14OSSI $\alpha$ -2a- 4T20V22Q	Thr <sup>4</sup> , Val <sup>20</sup> , Gln <sup>22</sup>	1,130 $\pm$ 180
HM 10613	実施例 2	pT14NSSI $\alpha$ -2a- 4T22Q	Thr <sup>4</sup> , Gln <sup>22</sup>	750 $\pm$ 144
HM 10614	実施例 2	pT14MSSI $\alpha$ -2a- 4T22Q	Thr <sup>4</sup> , Gln <sup>22</sup>	420 $\pm$ 100
HM 10702	実施例 1 (1)	pT14SSI $\alpha$ -2b-4T	Thr <sup>4</sup>	370 $\pm$ 90
HM 10703	実施例 1 (2)	pT14OSSI $\alpha$ -2b- 4T	Thr <sup>4</sup>	735 $\pm$ 117
HM 10711	実施例 1 (2)	pT14OSSI $\alpha$ -2b- 4T22Q	Thr <sup>4</sup> , Gln <sup>22</sup>	1,070 $\pm$ 150
HM 10712	実施例 1 (3)	pT14OSSI $\alpha$ -2b- 4T20V22Q	Thr <sup>4</sup> , Val <sup>20</sup> , Gln <sup>22</sup>	820 $\pm$ 160

註) \* IFN  $\alpha$  mg / 100 0.D<sub>600nm</sub> / L培養液

#### 【〇〇五八】

##### 実施例 4 : 後処理および精製

実施例 3 と同様の方法で実施例 1 の (2) で得られた大腸菌形質転換株 HM 10611 を培養した後、培養液を 6, 000 r.p.m で 20 分間遠心分離して細胞を収穫し、浸透圧ショック法によってペリプラズム分画を収穫した。

収穫されたペリプラズム分画を pH 5.0 ~ 5.5 に調整した後 pH 5.3 に予め平衡化された S-セファロース (S-Sepharose; Pharmacia Inc., Sweden) カラムに結合させ、25 mM NaCl 溶液で十分洗浄した。その後、各々 50 mM、100 mM、200 mM および 1 M NaCl 溶液を含む酢酸緩衝溶液を連続的に加えて IFN  $\alpha$ -2 を溶離させ、IFN  $\alpha$ -2 を含む分画を集め、合せた。

### 【〇〇五九】

合せた分画をブルーセファロース (Blue Sepharose; Pharmacia Inc., Sweden) カラムクロマトグラフィーに通し、2M以上のNaClを含むカラム緩衝溶液を加えて溶離させて活性分画を得た。

### 【〇〇六〇】

前記活性分画を緩衝液に透析した後、最終的にpH5.8でDEAE陰イオン交換樹脂カラムを用いた樹脂カラム分画を行って99%以上の純度を有するインターフェロン $\alpha$ -2aを得た。また、大腸菌形質転換株HM 10711を用いて同様の実験を繰り返してインターフェロン $\alpha$ -2bを精製した。

### 【〇〇六一】

精製されたインターフェロン $\alpha$ -2aおよび2bの純度と大略の濃度を決定するため SDS-PAGEを行ってから実施例3のような通常の酵素免疫測定法を用いてペリプラズム溶液内インターフェロン $\alpha$ の正確な濃度を分析した。また、N-末端アミノ酸配列分析を通じてインターフェロン $\alpha$ -2aおよび2bは追加のメチオニンを有しない天然型であることを確認した。

### 【〇〇六二】

実施例5：組換え菌株から生成したインターフェロン $\alpha$ -2aの分子量確認

SDS-PAGEおよびウェスタンプロッティングを用いて組換え菌株から生産されたインターフェロン $\alpha$ -2aおよび2bの発現および分子量を確認した。

まず、実施例4で得られた大腸菌形質転換株HM 10611のペリプラズム分画およびこれを精製したIFN $\alpha$ -2aを、IFN $\alpha$ -2a商用対照品( $3 \times 10^6$  IU/mI)を対照群として、通常の方法に従ってSDS-PAGEで分析した。図5aは前記SDS-PAGE結果を示すもので、ここでレーン(lane)1はIFN $\alpha$ -2a対照群であり、レーン2は大腸菌形質転換株HM 10611のペリプラズム分画であり、レーン3は精製されたIFN $\alpha$ -2aである。図5aから分かるように、精製されたインターフェロン $\alpha$ -2aが天然型インターフェロン $\alpha$ -2aと同様の分子量を有し、大腸菌形質転換株HM 10611のペリプラズム分画に大量で含まれていることを確認した。

### 【〇〇六三】

また、形質転換株HM 10711のペリプラズム分画、S-セファロースカラムカラ

ムクロマトグラフィーで精製された分画および最終精製されたIFN $\alpha$ -2bを用いて通常の方法でSDS-PAGEを行った。

【〇〇六四】

ニトロセルロース膜(Bio-Rad Lab, USA)をブロッティング(blotting)用緩衝液(170mMグリシン(glycine)、25mM Tris・HCl(pH 8)、20%メタノール)に十分濡らした後ゲル上に分離されたタンパク質をブロッティングキットを用いて3時間にわたってニトロセルロース膜に移した。その後ニトロセルロース膜を1%カゼイン溶液に1時間放置し、0.05%ツイーン20(Tween 20)を含むPBS溶液で3回洗浄した。洗浄後、ウサギ抗-IFN $\alpha$ 抗体(Chemicon, # AB1434, USA)をPBSで稀釀して加えてから室温で2時間反応させた。反応が終了した後PBS-T溶液で3回洗浄して反応しなかった抗体を除去した。これにHRP(horseradish peroxidase)-接合されたヤギ抗-ウサギIgG(Bio-Rad Lab, USA)溶液をPBSで稀釀して加えた後、さらに室温で2時間反応させた。その後、膜をPBS-Tで洗浄し、ベルオキシダーゼ基質キット(Bio-Rad Lab, USA)溶液を加えて発色させた。前記ウェスタンプロッティング結果を図5bに示し、ここでレーン1は形質転換株HM 10711の酵酛後のペリプラズム分画、レーン2はS-セファロースカラムクロマトグラフィーで精製された分画、レーン3は最終精製されたIFN $\alpha$ -2bを示す。

【〇〇六五】

本実施例の結果から、本発明の組換え大腸菌菌株から大量の可溶性インターフェロン $\alpha$ が発現されることを確認できる。

【〇〇六六】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

受領人：Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡八灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

<b>I.微生物の表示</b>	
寄託者による識別標識 :	国際寄託機関が付与した受託番号 :
HM10603	KCCM-10175
<b>II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置</b>	
上記I欄に表示された微生物には次が添付されている :	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 <small>(適用欄に x 表示)</small>	
<b>III.受付および受託</b>	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受けられた(原寄託日) <sup>1</sup>	
<b>IV.国際寄託機関</b>	
名称 : 韓国微生物保存センター	本国際寄託機関の代表者署名 :
住所 : 120-091 大韓民国ソウル西大门区弘濟 1 洞 361-221 Yurim B/D	日付 : 1999 年 12 月 29 日

<sup>1</sup> 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【0067】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

受領人 : Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡ハ灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

<b>I.微生物の表示</b>	
寄託者による識別標識 :	国際寄託機関が付与した受託番号 :
HM10611	KCCM-10176
<b>II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置</b>	
上記I欄に表示された微生物には次が添付されている :	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 <small>(適用欄に x 表示)</small>	
<b>III.受付および受託</b>	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受けられた(原寄託日) <sup>1</sup>	
<b>IV.国際寄託機関</b>	
名称 : 韓国微生物保存センター	本国際寄託機関の代表者署名 :
住所 : 120-091 大韓民国ソウル西大门区弘濟 1 洞 361-221 Yurim B/D	日付 : 1999 年 12 月 29 日

<sup>1</sup> 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

**【0068】**

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約  
国際様式

受領人 : Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡ハ灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

<b>I.微生物の表示</b>	
寄託者による識別標識： HM10703	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10177
<b>II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置</b>	
上記I欄に表示された微生物には次が添付されている：  <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 <small>(適用欄に x 表示)</small>	
<b>III.受付および受託</b>	
本国際寄託機関は、上記Iに表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受けられた(原寄託日) <sup>1</sup>	
<b>IV.国際寄託機関</b>	
名称：韓国微生物保存センター 住所：120-091 大韓民国ソウル西大門区弘濟 1 洞 361-221 Yurim B/D	本国際寄託機関の代表者署名： 日付：1999 年 12 月 29 日

<sup>1</sup> 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【0069】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約  
国際様式

受領人：Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡ハ灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識 :	国際寄託機関が付与した受託番号 :
HM10711	KCCM-10178
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
<p>上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている：</p> <p>[ ] 科学的性質  [ ] 分類学上の位置  (適用欄に x 表示)</p>	
III.受付および受託	
<p>本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受けられた(原寄託日)<sup>1</sup></p>	
IV.国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター	本国際寄託機関の代表者署名 :
住所：120-091 大韓民国ソウル西大门区弘濟 1 洞 361-221 Yurim B/D	日付：1999 年 12 月 29 日

<sup>1</sup> 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Hanmi Pharm. Co., Ltd.

<120> Expression and secretion vector for human interferon alpha and process for producing human interferon alpha by employing same

<130> PCA10105/HMY

<150> KR 2000-2434

<151> 2000-01-19

<160> 34

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met  
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp  
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln  
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe  
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Tri Asp Glu Thr Leu  
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu  
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Pro Leu Met Lys  
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu  
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg  
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser  
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu  
165

<210> 2

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met  
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp  
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln  
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe  
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu  
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu  
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys  
100                    105                    110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu  
115                    120                    125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg  
130                    135                    140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser  
145                    150                    155                    160

Leu Arg Ser Lys Glu  
165

<210>        3

<211>        23

<212>        PRT

<213>        Escherichia coli

<400>        3

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser  
1                5                            10                    15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala  
20

<210>        4

<211>        69

<212>        DNA

<213>        Artificial Sequence

<220>

<223>        DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II  
([Thr4] ST II)

<400>        4

atgaaaaaga caatcgatt tcttcttgc a tcatgttcg tttttctat tgctacaat	60
gcctacgct	69
<210> 5	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II ([Thr4, Gln22] ST II)	
<400> 5	
atgaaaaaga caatcgatt tcttcttgc a tcatgttcg tttttctat tgctacaat	60
gcctaagct	69
<210> 6	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II ([Thr4, Val20, Gln22] ST II)	
<400> 6	
atgaaaaaga caatcgatt tcttcttgc a tcatgttcg tttttctat tgctacagt	60
gcctaagct	69
<210> 7	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II ([Thr4, Val20] ST II)	

<400>	7	
atgaaaaaga caatgcatt tcttcgtca ttatgttcg ttttttcat tgcacagtt		60
gcctacgcg		69
<210>	8	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	8	
gagggtgattt t		11
<210>	9	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Modified Shine-Dalgarno sequence of E. coli thermostable enterotoxin II	
<400>	9	
gagggtgittt		10
<210>	10	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing the N-terminal of interferon alpha-2a	
<400>	10	
cggccgcata tggtgtaact gcctcaaacc cacag		35

<210>	11	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing the C-terminal of interferon alpha-2a	
<400>	11	
acggaaatcg gatccctatt ccttaatctt taaact		36
<210>	12	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for the preparation of the secretion sequence of E. coli thermostable enterotoxin II	
<400>	12	
tcatgaaaaa gaataatcgea ttctttcttg catatatgtt cgttttttctt aatgtaccaa		60
atgcctacgc gt		72
<210>	13	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for the preparation of the secretion sequence of E. coli thermostable enterotoxin II	
<400>	13	
acgcgttaggc aattttagca atagaaaaaa cgaacataga tgcaagaaga aatgogatat		60
tcttttcat ga		72

<210>	14	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	<i>primer for preparing the N-terminal of interferon alpha-2a</i>	
<400>	14	
acaaatgcct acgegigtgatctgcctcaa acccacag		38
<210>	15	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	<i>primer for preparing the C-terminal of interferon alpha-2a</i>	
<400>	15	
accgaattcg gatcccatat ctttacttcttaaact		36
<210>	16	
<211>	65	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	<i>primer for introducing Shine-Dalgarno sequence of E. coli ST II</i>	
<400>	16	
cggtttccct ctagagggttg aggttgttta tggaaaagaaa tatcgcattt ctcttgtat		60
ctatg		65
<210>	17	
<211>	36	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for introducing Shine-Dalgarno sequence of E. coli ST II

<400> 17

acogaattcg gatcttcattt ccttacatct taaact

36

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Leu Leu Ala Gin Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys

1

5

10

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide for preparing interferon alpha-2b

<400> 19

ctcttggeac agatgaggag aatcttcitl ttcttcgtc

39

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-sense of SEQ ID NO: 19

<400> 20

gaggaccg lg tctactctc tttagagagaa aagaggacg

39

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1st to 8th amino acids of [Thr4] ST II

<400> 21

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu

1 5

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide for preparing [Thr4] ST II

<400> 22

ggtgatttt aaaaaagac aatcgcaittt cttc

34

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti-sense of SEQ ID NO: 22

<400> 23

gaagaatgc gatttgtttt ttccataaaaat cacc

34

<210> 24

<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> 20th to 27th amino acids of [Gln22] ST II  
  
<400> 24  
Asn Ala Gln Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His  
1 5 10

<210> 25  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> oligonucleotide for preparing [Gln22] ST II  
  
<400> 25  
caaatgecca agcgtgtgat ctgcctaaaa cccacag 37

<210> 26  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> anti-sense of SEQ ID NO: 25  
  
<400> 26  
ctgtgggtt gagggcagatc acacgcttgg gcatttg 37

<210> 27  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer for preparing the modified Shine-Dalgarno sequence of SEQ  
ID NO: 9

<400> 27  
tcttagagggtt gagggtttt atga 24

<210> 28  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> anti-sense of SEQ ID NO: 27

<400> 28  
tcataaaaca cctcaaccc tc taga 24

<210> 29  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide for preparing [Val20] ST II

<400> 29  
gttttttcta ttgctacagt tgcccaagcg tggatctgc ct 42

<210> 30  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

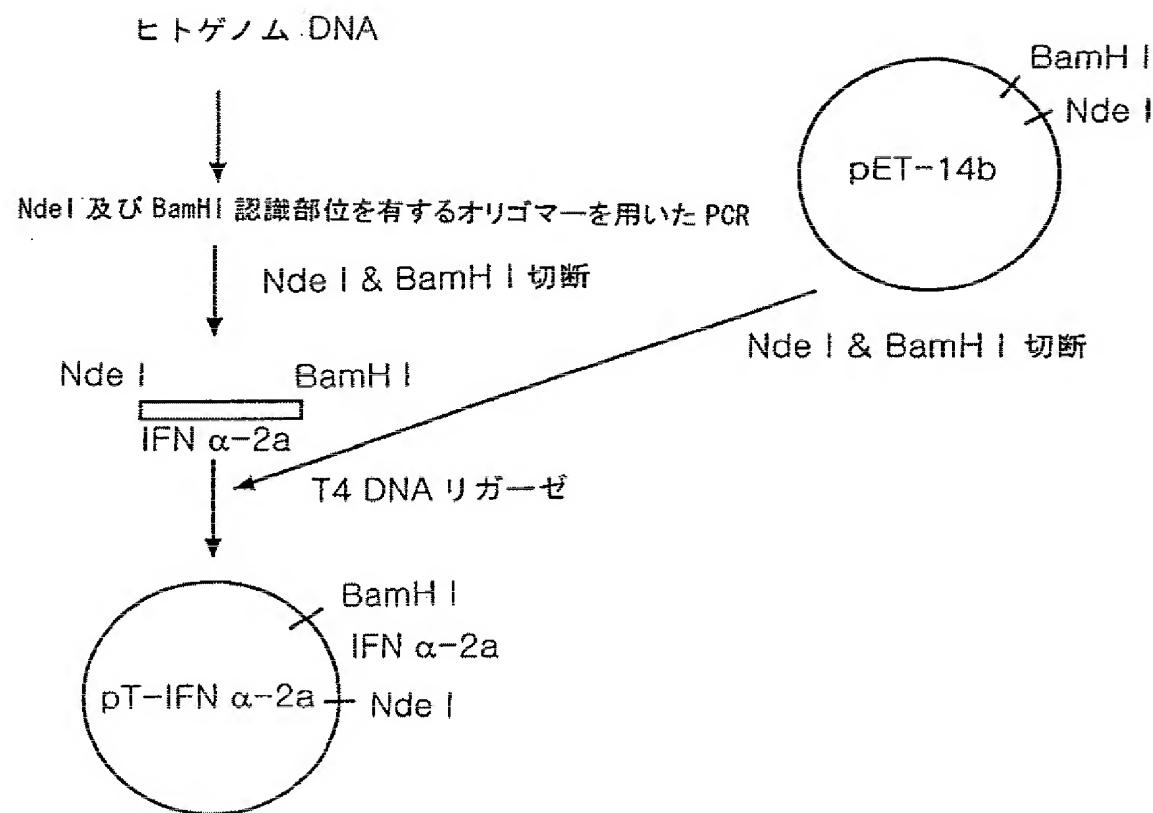
<220>  
<223> anti-sense of SEQ ID NO: 29

<400>	30	
aggcagatca	cacgcttggg caactgttagc	aatagaaaaa ac
		42
<210>	31	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing a modified Shine-Dalgarno sequence	
<400>	31	
tctagaggtt	gaggttta	tgaaa
		25
<210>	32	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	anti-sense of SEQ ID NO: 31	
<400>	32	
tttcataaaa	acctcaacct	ctaga
		25
<210>	33	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing a modified Shine-Dalgarno sequence	
<400>	33	
tctagaggtt	gaggtttat	gaaa
		24
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	anti-sense of SEQ ID NO: 33	
<400>	34	
ttcataaaa	cctcaaccic	taga
		24

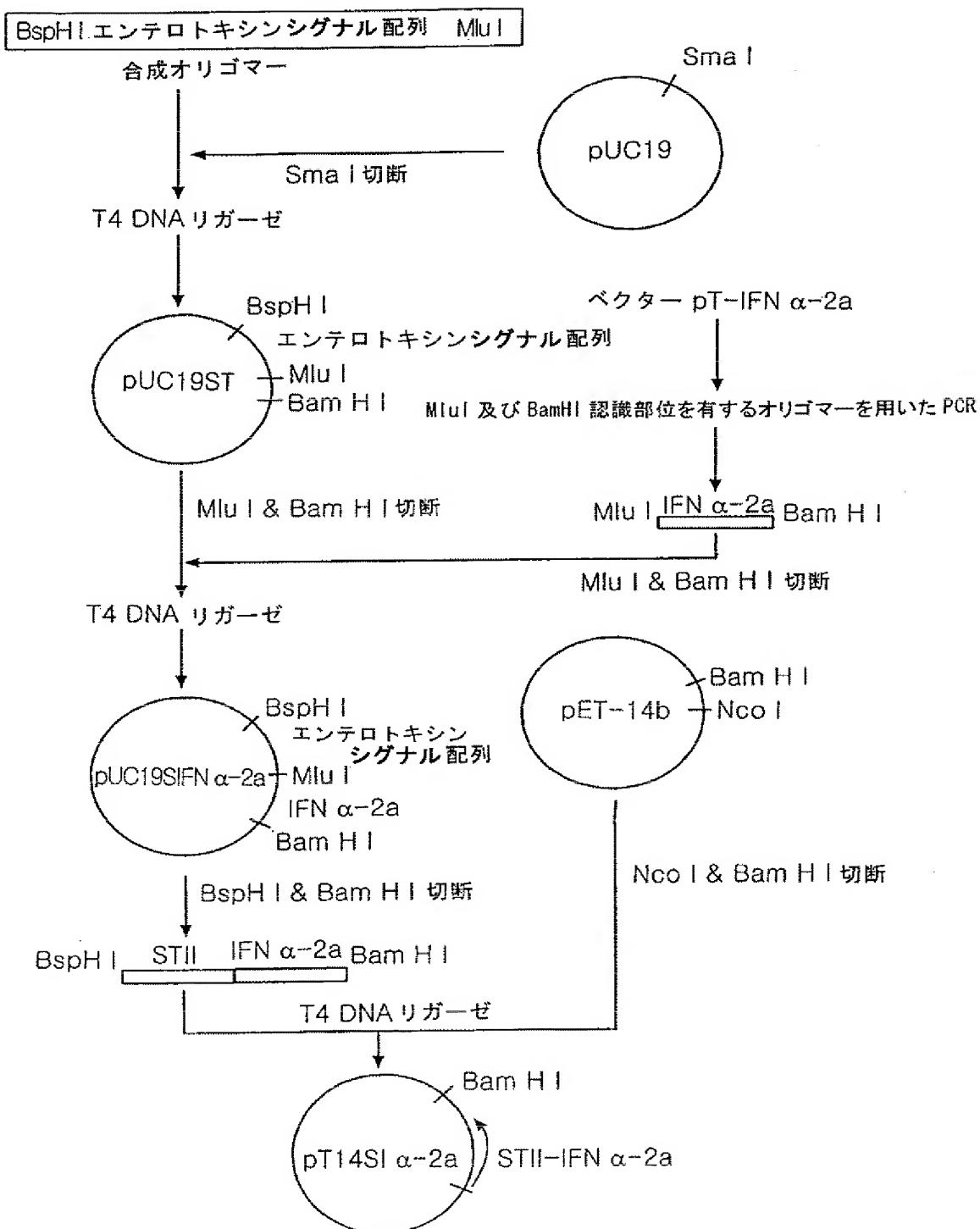
【図面の簡単な説明】

- 【図1】 図1は、ベクターpT-IFN $\alpha$ -2aの製作過程を示す。
- 【図2】 図2は、ベクターpT14S1 $\alpha$ -2aの製作過程を示す。
- 【図3】 図3は、ベクターpT14SS1 $\alpha$ -2aの製作過程を示す。
- 【図4】 図4は、ベクターpT140SS1 $\alpha$ -2a-4T22Qの製作過程を示す。
- 【図5】 図5 aおよび図5 bは、組換え細胞株からのインターフェロン $\alpha$ -2a(IFN $\alpha$ -2a)の発現如何と、発現されたIFN $\alpha$ -2aの精製度を確認したSDS-PAGE結果および発現されたIFN $\alpha$ -2aの分子量を確認したウェスタンブロッティング結果を示す。

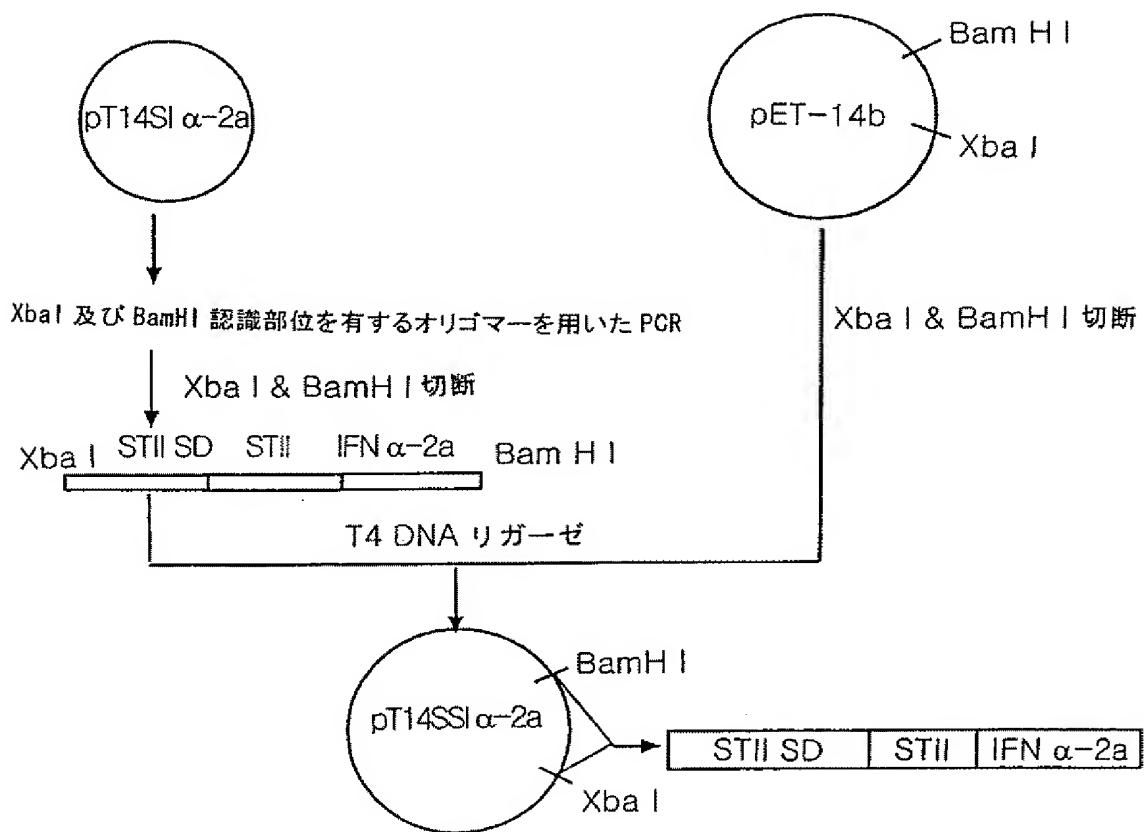
【図1】



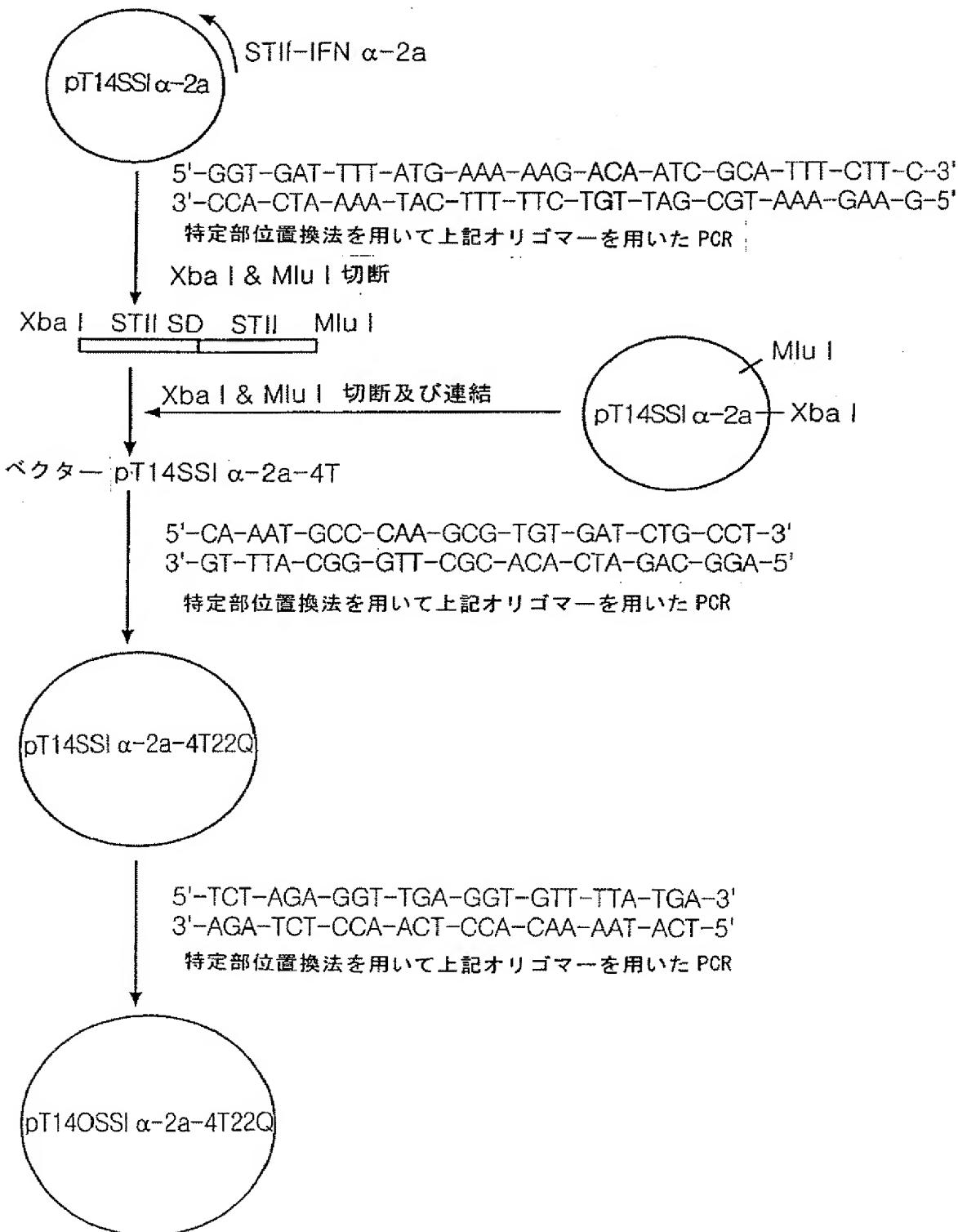
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

図 5A

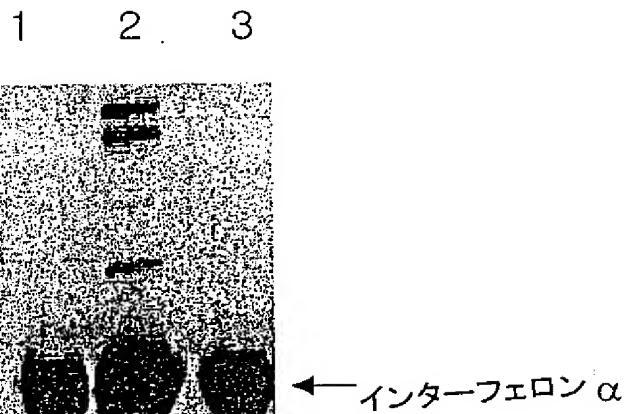
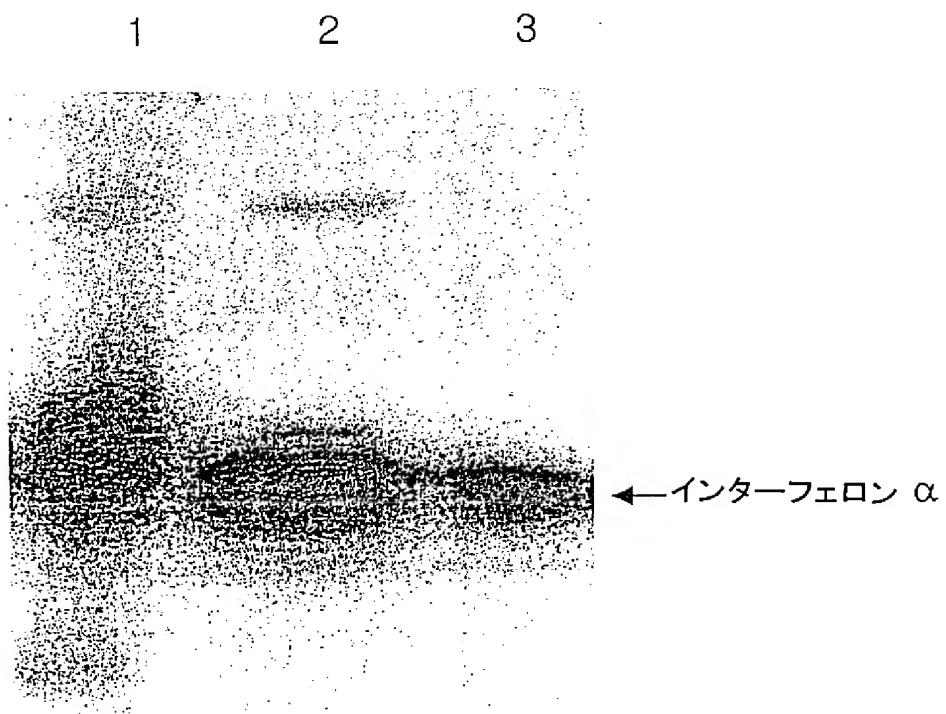


図 5B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR01/00097
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC7 C12N 15/21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7 C12N 15/70, 15/00; C12N 12/00; C12P 21/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for Inventions since 1975		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practicable, search terms used) IBM, PAJ, NCBI		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5.710,027 A (Boehringer Ingelheim International GmbH) 20 Jan, 1998 see the whole document	1, 3, 11, 13
Y	CHANG CN, REY M, BOCHNER B, HEYNKER H & GREY G 'High-level secretion of human growth hormone by Escherichia coli' In: Gene, vol.55, no. 2-3, 1987, p189-196 see the whole document	4-6, 14-16
Y	SAHEED AM, MAGNUSON NS, SRIANGANATHAN N, BURGER D & COSAND W 'Molecular homogeneity of heat-stable enterotoxins produced by bovine enterotoxigenic Escherichia coli' In: Infect. Immun., vol.45, no.1, 1984, p242-247 see the whole document	1, 2, 11, 12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"I&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search <b>11 MAY 2001 (11.05.2001)</b>	Date of mailing of the International search report <b>14 MAY 2001 (14.05.2001)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office	Authorized Officer <b>ARN. Mi-Chung</b>	
Fax/fax No.	Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/KR01/00097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5710027A	20.01.1998	JP 7135992A2 EP 626448A3 DE 4329756A1 CN 1099799A CA 2124271AA	30.05.1995 14.01.1998 09.03.1995 08.03.1995 27.11.1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

---

フロントページの続き

(72) 発明者 チョイ・キド

大韓民国135-243ソウル、ガンナムグ、ゲ  
ポ3 ドン、ゲポ・ジュゴン・アパートメン  
ト601-407

(72) 発明者 キム・チャソン

大韓民国449-840ギヨンギド、ヨンイン  
シ、スジウプ、ポンドウクチョンリー・ナ  
ンバー664番、ポンリム・アパートメント  
106-903

(72) 発明者 ベ・スンミン

大韓民国151-054ソウル、クワンナクグ、  
ポンチョン4 ドン・ナンバー1587-8番、  
303

(72) 発明者 リー・グワンスン

大韓民国138-160ソウル、ソンバグ、ガラ  
クドン、ククドン・アパートメント2-  
806

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA23 CA04 CA05

CA06 DA06 EA04 FA17 GA11

GA19 HA03 HA08 HA12

4B064 AG09 CA02 CA19 CC24 CE10

CE11 DA01

4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14

AC15 BA02 CA24 CA44